


PRODUCTION OF VALUABLE PROTEIN

Patent Number: JP62044198
Publication date: 1987-02-26
Inventor(s): HANADA KEIZO
Applicant(s): TORAY IND INC
Requested Patent:  JP62044198
Application Number: JP19850183926 19850823
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P21/00; C12N15/00
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To produce useful protein in high efficiency, by culturing transformed *Escherichia coli* in a medium added with amino acid.

CONSTITUTION: A production medium is prepared by adding ≥ 10 mg/l of one or more amino acids selected from L-methionine, L-serine, L-tyrosine and L-arginine to a medium containing a carbon source such as glucose, a nitrogen source such as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, an organic nutrient source such as peptone, etc. The amount of each amino acid in the medium is adjusted to respective specific level. A strain such as *E. coli* K-12 C-600, etc., is transformed by an expression plasmid integrated with a DNA fragment coding a useful protein such as alpha-interferon, and the obtained *E. coli* is inoculated in the above production medium and cultured at 5-8 pH and 20-37 deg.C for 1-4 days.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-44198

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)2月26日

C 12 P 21/00

6712-4B

C 12 N 15/00

7115-4B

//C 12 P 21/00

C 12 R 1:19)

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 有用タンパク質の生産方法

⑮ 特 願 昭60-183926

⑯ 出 願 昭60(1985)8月23日

⑰ 発 明 者 花 田 敬 三 鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

⑱ 出 願 人 東 レ 株 式 会 社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番地

明 細 書

1. 発明の名称

有用タンパク質の生産方法

2. 特許請求の範囲

(1) 有用タンパク質をコードするDNA断片が組み込まれた発現プラスミドにより形質転換された大腸菌を培養して有用タンパク質を生産するに際し、培地中にアミノ酸を添加することを特徴とする有用タンパク質の生産方法。

(2) アミノ酸が、L-メチオニン、L-セリン、L-チロシンおよびL-アルギニンからなる群から選ばれる1種以上である特許請求の範囲第(1)項記載の生産方法。

(3) アミノ酸の添加量が、10mg/ℓ以上である特許請求の範囲第(1)項記載の生産方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は組換えDNA技術により形質転換された大腸菌を用いて有用タンパク質を生産する方法に関する。

(従来技術)

近年、急速に発展しつつある組換えDNA技術により、有用タンパク質も大腸菌を用いて生産することが可能になった (Itakura, K. et al., Science, 198, 1056-1063 (1977), Goeddel, D. V. et al., Nature, 287, 411 (1980), Taniguchi, T. et al., Proc. Jpn. Acad. B., 55, 464 (1979))。

インターフェロン、インターロイキン2のような有用タンパク質の利用を考える場合、生産量の向上は重要である。生産量の向上には、プラスミドの改良と、培養方法の改良等が考えられる。プラスミドの改良による生産量向上にはいくつかの報告がある (Goeddel, D. V. et al., Nucleic Acids Res., 8, 4057-4074, 1980) が培養方法の改良による生産性向上は未だ十分でなく、該改良による生産性の向上が望まれている。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、大腸菌を用いて有用タンパク質を生産するに際し、培養方法による生産量の向上を目的とするものである。

(問題点を解決するための手段)

上記の目的は以下の本発明により達成される。すなわち本発明は、有用タンパク質をコードするDNA断片が組み込まれた発現プラスミドにより形質転換された大腸菌株を培養して、有用タンパク質を生産するに際し、培地中にアミノ酸を添加することを特徴とする有用タンパク質の生産方法である。

本発明の有用タンパク質とは、組換えDNA技術により生産できるものであれば特に限定されないが、たとえば α -、 β -、 γ -インターフェロン、インターロイキン-2等のリンホカイン；インシュリン、ヒト生長ホルモン、ソマトスタチン等のホルモン；ジヒドロ葉酸還元酵素、ウロキナーゼ等の酵素などが挙げられる。

本発明の発現プラスミドは、有用タンパク質が大腸菌内で生産されるように該タンパク質をコードするDNA断片が翻訳開始信号とともに、プロモーター制御下に組み込まれているプラスミドであり、このプラスミドは公知の方法（た

を適宜含有する産生培地が使用される。具体的にはLB（酵母エキス0.5%、バクトトリプトン1.0%、食塩0.5%、グルコース0.2%、pH7.0~7.1）を代表とする天然培地、およびM9（リン酸1カリ0.3%、リン酸2ナトリウム0.6%、塩化ナトリウム0.5%、塩化アンモニウム0.1%、グルコース、硫酸マグネシウム0.02%）、Davisの培地、Vogel & Vonner培地などの合成培地と、更にそれにカザミノ酸、酵母エキスなどを加えた半合成培地等が挙げられるが特にこれに限定されるものではない。

本発明は、これらの産生培地にアミノ酸を添加することを特徴とする。

上記培地には通常、微量（0.1g/l程度）のアミノ酸が含まれているが、本発明のアミノ酸添加とは培地成分以外に、粗精製もしくは精製されたアミノ酸を添加することをいう。

本発明のアミノ酸は上記培地中で消費量の最も多いアミノ酸であり、具体的にはL-メチオ

たとえば、Goeddel, D.V. et al., *Nucleic Acids Res.*, 8, 4057 (1980))により作成することができる。

該発現プラスミドにより大腸菌を形質転換する方法としては、たとえばMandel, M. & Hage, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 154 (1970)等の方法を採用することができる。

宿主である大腸菌の種類は特に限定されないが、L-メチオニン、L-セリン、L-チロシンまたはL-アルギニンを栄養要求としないものが好ましく、具体的にはK-12系のC-600, HB101等が挙げられる。

形質転換された大腸菌を、培地に接種し、続いて培養することにより目的とする有用タンパク質を生産させることができる。培地としてはグルコース、グリセリンなどの炭素源、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの窒素源、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、カゼイン分解物及びペプトンなどの有機栄養源、リン酸塩などの無機塩、マグネシウム、カリウム、鉄、その他微量金属等

ニン、L-セリン、L-チロシン、L-アルギニン等である。これらの少なくとも一種以上を添加する。

アミノ酸の添加量は、基本とする培地組成、培養条件、アミノ酸の種類により多少異なるが、添加量が通常10mg/l以上であり、特に0.03~10g/lが好ましい。

個々のアミノ酸の添加量はL-メチオニンの場合は0.05~0.6g/l、L-セリンの場合は1.0~7.0g/l、L-チロシンの場合は0.03~0.5g/l、L-アルギニンの場合は1.0~3.0g/lが好ましい。

添加方法としては、培養の初期に添加する初発添加でも良いし、断続的もしくは連続的に添加する逐次添加でも良く、またこれらを組合せて添加する方法でも良い。

培養は、好ましくはpHは5~8程度、培養温度は20~37℃程度、培養時間は1~4日程度で行う。

(発明の効果)

本発明方法は、有用タンパク質の生産性を著しく向上させることができ、実施例からも明らかな様に、アミノ酸を添加しない培地に比べインターフェロンの場合は生産量を2～4倍量にすることができる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これにより本発明の有用性が限定されるものではない。

実施例1

ヒトβ型インターフェロン発現プラスミドを保持する大腸菌HB101/pKM6を、2.5ℓ容ミニジャーを用いて培養した。pKM6は、プラスミドpKT1-9のSD-ATC間の塩基配列を修飾することにより得た。

pKT1-9は、tufBプロモーター支配下にヒトインターフェロンβポリペプチドをコードするDNA断片が組み込まれた発現プラスミドpTuBIPN-β-5(谷口、生化学54,363(1982))を、EcoRIとClaIで処理し、tufBプロモーター断片を除去した後、その部分に入trpNM778-6(A

S.Hopkins et al., J.Mol.Biol.107,549(1976))由来のTrpプロモーター、SD配列を含むEcoRI-TagI断片を挿入することにより得た。pKT1-9のSD-ATC間塩基配列は、AGGTATCTACATGであるが、本配列について合成DNAオリゴマーを用いて修飾を加え、AGGTTTGAAATCGATGとしたものがpKM6である。

1ℓの生産培地(リン酸1カリウム0.3%、リン酸2ナトリウム0.6%、塩化ナトリウム0.5%、塩化アンモニウム0.1%、グリコース0.5%、カザミノ酸0.5%、硫酸マグネシウム1mM、ビタミンB₁₂ 6μg/ml、アンピシリン50μg/ml)に各種アミノ酸を添加し、2.5ℓ容ミニジャーに仕込んだ。アミノ酸は、L-セリン、L-メチオニン、L-チロシンを各々使用した。

ミニジャーは、攪拌数600rpm、通気量1vvm、25℃の条件で運転した。トリプトファンオペロンの誘導物質であるインドールアクリル酸を加え、グリコースとカザミノ酸混液を添加しながら60時間培養した。

第1表

	アミノ酸	添加量(g/ℓ)	ヒトβ型インターフェロン 生産量相対値
1	無添加	—	100
2	L-セリン	2	150
3	L-メチオニン	0.1	193
4	L-チロシン	0.04	183

実施例2

ヒトβ型インターフェロン発現プラスミドを保持する大腸菌HB101/pKM6を、2.5ℓ容ミニジャーを用いて実施例1と同様に培養した。

培地は、実施例1と同様の生産培地を使用し、各種アミノ酸を連続的に添加した。

アミノ酸は、L-セリン6.4g/ℓ、L-メチオニン3.2g/ℓ、をそれぞれ単独添加した。

また、L-セリン^{6.4}g/ℓ、L-メチオニン480mg/ℓ、L-チロシン190mg/ℓ、L-

菌体濃度は最終的にOD550nmで30～40に到達した。菌体を10,000×g、5分間の遠心分離により集め、生理食塩水で1回洗浄した。

集めた菌体を、リゾチームEDTAを含むトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に懸濁し、氷中で60分間放置した。

凍結融解を2回くり返し菌体を破砕した後、30,000×g、20分間の遠心分離により細胞残滓を除去したものをインターフェロン定量用抽出液とした。

ヒトβ型インターフェロンの定量は、ヒト羊膜由来FL細胞、Vesicular stomatitis virusを用いたCPE50法を用いた。結果を第1表に示す。

アルギニン1.6g/ℓの4種のアミノ酸を組みあわせて添加した。菌体からのヒトβ型インターフェロンの抽出方法、及び定量方法は実施例1に従った。結果は第2表に示す。

第2表

	アミノ酸 組合せ	添加量 (g/ℓ)	ヒトβ型インターフェロン 生産量相対値
1	無添加	—	100
2	L-セリン	6.4	140
3	L-メチオニン	3.2	136
4	L-セリン L-メチオニン L-チロシン	6.4 0.48 0.19	290
5	L-メチオニン L-チロシン L-アルギニン	0.48 0.19 1.6	167
6	L-セリン L-メチオニン L-アルギニン	6.4 0.48 1.6	200
7	L-セリン L-チロシン L-アルギニン	6.4 0.19 1.6	167
8	L-メチオニン L-チロシン L-アルギニン L-セリン	0.48 0.19 1.6 6.4	233

実施例3

ヒトβ型インターフェロン発現プラスミドを保持する大腸菌HB101/pKM6を、実施例1に示す生産培地1ℓを、2.5ℓ容ミニジャーに仕込み培養した。

培養は実施例1と同様に行った。アミノ酸は、初発にL-セリン1.2g/ℓを添加し同時に、L-セリン6.4g/ℓ、L-メチオニン0.48g/ℓ、L-チロシン0.19g/ℓを連続的に添加した。菌体からのヒトβ型インターフェロンの抽出方法、及び定量方法は、実施例1と同様に行った。結果は第3表に示す。

第3表

	アミノ酸		添加量 (g/l)	ヒトβ型インターフェロン 生産量相対値
	添加方法	種類		
1		無添加	—	100
2	組みあわせ	初発	L-セリン 1.2	400
		連続	L-セリン L-メチオニン L-チロシン 6.4 0.48 0.19	

特許出願人 東レ株式会社